

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-504695

(P2002-504695A)

(43) 公表日 平成14年2月12日 (2002.2.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566		37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	F
		審査請求 未請求	予備審査請求 有 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願2000-533440 (P2000-533440)  
 (86) (22) 出願日 平成11年2月23日 (1999.2.23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成12年8月24日 (2000.8.24)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 0 3 8 6 2  
 (87) 国際公開番号 W O 9 9 / 4 3 6 8 8  
 (87) 国際公開日 平成11年9月2日 (1999.9.2)  
 (31) 優先権主張番号 0 9 / 0 2 8 , 8 0 6  
 (32) 優先日 平成10年2月24日 (1998.2.24)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (81) 指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,  
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I  
 T , L U , M C , N L , P T , S E ) , A U , C A , J  
 P , M X

(71) 出願人 サーマディックス、インコーポレイティド  
 アメリカ合衆国、ミネソタ 55344、イー  
 デン プレイリー、ウェスト セブンティ  
 フォース ストリート 9924  
 (72) 発明者 ガイア、バトリック イー。  
 アメリカ合衆国、ミネソタ 55346、イー  
 デン プレイリー、タータン サークル  
 6741  
 (72) 発明者 スワンソン、メルビン ジェイ。  
 アメリカ合衆国、ミネソタ 55315、カー  
 パー、マウント カーマル ロード 5290  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光活性化可能な核酸誘導体

## (57) 【要約】

1以上の光反応性基が天然または合成核酸に結合している、光活性化可能な核酸誘導体組成物。光反応性基は核酸の生成前、生成中または生成後に核酸に結合させることができ、その後、核酸を他の分子、たとえば、固体支持体に結合するために活性化することができる。上記組成物の製造方法、及び上記組成物を核酸を他の分子、たとえば、光リトグラフ技術により核酸チップを製造するのに用いられる基体の表面により提供されるものに結合させるのに用いる方法も記載されている。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 1以上の結合した光反応性基を有する核酸を含む光活性化可能な核酸誘導体を含む組成物であって、そこで、前記光反応性基の各々が、ニトレン、カルベン及び電磁エネルギーの吸収により励起状態のケトンからなる群から選択される活性種を生じるものである前記組成物。

【請求項2】 前記光基が光活性化可能なアリールケトンを含む請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 前記アリールケトンが、アセトフェノン、ベンゾフェノン、アントラキノン、アントロン及びそれらの誘導体からなる群から選択される請求項2に記載の組成物。

【請求項4】 前記光反応性基が前記核酸に直接的に、かつ、共有結合している請求項1に記載の組成物。

【請求項5】 少なくとも1個の光反応性基が前記核酸の3'末端または5'末端のいずれかに結合している請求項4に記載の組成物。

【請求項6】 前記末端光反応性基が光活性化可能なアリールケトンである請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 前記アリールケトンがアセトフェノン、ベンゾフェノン、アントラキノン、アントロン及びそれらの誘導体からなる群から選択される請求項6に記載の組成物。

【請求項8】 前記光反応性基が前記核酸に間接的に、かつ、共有結合している請求項1に記載の組成物。

【請求項9】 前記核酸及び光反応性基が、合成ポリマー及び天然ポリマーからなる群から選択される共通の構造に結合している請求項8に記載の組成物。

【請求項10】 少なくとも1個の光反応性基が間接的に前記核酸の3'末端または5'末端のいずれかに結合している請求項9に記載の組成物。

【請求項11】 前記末端光反応性基が光活性化可能なアリールケトンを含む請求項10に記載の組成物。

【請求項12】 前記アリールケトンがアセトフェノン、ベンゾフェノン、アントラキノン、アントロン及びそれらの誘導体からなる群から選択される請求

項11に記載の組成物。

【請求項13】 前記核酸が合成オリゴヌクレオチドである請求項1に記載の組成物。

【請求項14】 前記オリゴヌクレオチドがホスホラミダイト合成法により合成されたものである請求項13に記載の組成物。

【請求項15】 光活性化可能な核酸誘導体を含む組成物の製造方法であって、1以上の光反応性基を有する核酸を誘導体化する工程を含み、そこで、前記光反応性基の各々が、ニトレン、カルベン及び電磁エネルギーの吸収により励起状態のケトンからなる群から選択される活性種を生じるものである前記方法。

【請求項16】 前記核酸が酵素的修飾または化学的修飾のいずれかにより誘導体化される請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記核酸が、合成オリゴヌクレオチドに熱化学的に反応性の基を導入する工程並びに得られたオリゴヌクレオチドを対応する反応性基及び光反応性基を含む光反応性化合物と反応させる工程を含む化学的修飾により誘導体化される請求項16に記載の方法。

【請求項18】 熱化学的に反応性の基と対応する反応性基との反応が、アミン基とN-オキシスクシンイミドエステルとの反応、カルボン酸塩化物とアミンとの反応及びマレイミド基とメルカプト基との反応からなる群から選択される請求項17に記載の方法。

【請求項19】 前記化学的修飾工程が、熱化学的に反応性の基と光反応性基を含む異種2官能性試薬による、1以上の光反応性基の前記核酸への導入を含む請求項17に記載の方法。

【請求項20】 光活性化可能な核酸誘導体の製造方法であって、オリゴヌクレオチド合成の間に合成オリゴヌクレオチドに1以上の光反応性基を共有結合させる工程を含み、そこで、前記光反応性基の各々がニトレン、カルベン及び電磁エネルギーの吸収により励起状態のケトンからなる群から選択される活性種を生ずるものである前記方法。

【請求項21】 請求項20に記載の方法であって、a) 1以上の光反応性基で誘導体化された1以上のヌクレオチド構築ブロックを供給する工程及びb)

前記光反応性基がオリゴヌクレオチドの1以上の指定された点に結合することが可能となる方法で前記オリゴヌクレオチドの合成において前記誘導体化ヌクレオチドを用いる工程を含む前記方法。

【請求項22】 請求項1に記載の組成物を供給する工程及び表面に核酸を結合させるのに適当な条件下に前記光反応性基を活性化する工程を含む前記表面を処理する方法。

【請求項23】 固定化された核酸を担持する表面であって、請求項22の方法により製造された前記表面。

【請求項24】 共有結合した複数の核酸を含むプローブのアレーであって、前記核酸は活性化された光反応性基の残基を介して共有結合している前記プローブのアレー。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 技術分野

本発明は核酸の固定化に関する。他の面では本発明は上記核酸を導入する固体支持体、たとえば、オリゴヌクレオチド（「オリゴ」）チップに関する。なお他の面では、本発明は光反応性基、前記基で誘導体化された分子及び前記基の活性化による支持体表面への前記分子の結合に関する。

## 【0002】

## 関連出願への参照

本願は1997年8月15日に出願された、「生物学的に活性な部分を有する潜在的反応性ポリマー」についての米国特許出願第08/916,913号の部分継続出願である。

## 【0003】

## 発明の背景

オリゴヌクレオチド（「オリゴ」）プローブのアレー（array）〔より一般的には「DNAチップ」及び「Gene Chip」（Affymetrix Inc. の登録商標）の開発は過去数年にわたり顕著な進歩をとげ、常に増大する注目及び高まった重要性の中心となってきた。たとえば、Stipp, D. 「Fortune」, p.56（1997年3月31日）参照。Borman, S. 「C & EN」, p.42（1996年12月9日）及びTravis, J. 「Science News」 151, p.144-145（1997年）も参照。

## 【0004】

典型的には、オリゴヌクレオチドプローブのアレーは情報量の多いフォーマットにおいて正確な位置に特異的なオリゴヌクレオチド配列を表示する。使用に際しては、蛍光標識した核酸標的のハイブリダイゼーション型を標的に対する一次構造情報を得るために用いる。このフォーマットを、病原の同定、法廷の用途、mRNA発現の監視及び新規配列決定を包含する広範囲の核酸配列分析課題に適用することができる。たとえば、Lipshutz, R.J.他「BioTechniques」 19 (3), p.442～447（1995年）参照。上記アレーは時々、数万、あるいは数十万もの個々のプローブを担持する必要がある。チップも、1細胞当たり1～10,000個

のいかなるレベルでも発現し得る配列を検出するために広範囲の感度を提供する必要がある。

#### 【0005】

オリゴヌクレオチドプローブのアレーの製作及び／または使用のために多くのアプローチが開発されてきた。たとえば、Weaver他（WO 92／10092号）参照。この公報は、固体支持体上での大規模な化学的な多様性の創作のための合成方法を記載している。この系は、固相化学、光に不安定な保護基及び光リトグラフィを用いて、光指向性、場所的にアドレスで呼び出せる、平行化学合成を達成する。適当な配列のマスク及び化学的段階的反應を用いて、限定された一組のオリゴを、各々、アレーの表面の予め定められた位置に構築できる。

#### 【0006】

この技術を用いて、Affymetrix, Inc（カリフォルニア州サンタクララ）はシリコンウエーハに結合させたオリゴヌクレオチドの多数のマイクロアレーを開発した。使用に際して、研究員は、細胞または他の生物学的源からmRNAを抽出し、それをcDNAに変換し、試料を蛍光プローブで標識する。チップに結合したプローブに対して相補的な配列は、ウエーハにハイブリダイズし、各々の点の蛍光を測定することにより研究員にそれらの相対的な量を測定させるだろう。現在まで、たとえば、研究員は、この方法で、1000を超えるヒトの遺伝子の発現を定量的に測定することができた。

#### 【0007】

Affymetrixアプローチの1つの欠点は、表面に結合することができるオリゴの長さの制限である。この技術では、オリゴの合成に包含されるすべての付加工程は、いくつかの誤りまたは端を切り取られた配列をもたらすことが普通である。しかしながら、オリゴのチップでは、オリゴ配列は支持体に結合したままであるから、端を切り取られた配列を除去するために慣用の合成後精製技術（たとえば、HPLC）を実施できない。

#### 【0008】

Synteni（カリフォルニア州、パロアルト）は、ガラスのスライドにポリリシンを塗布することによりcDNAのアレーを製造する。cDNAのアレーを被覆

されたスライド上に印刷し、DNAをポリリシンで架橋するために、その後、紫外光に露出する。次いで未反応ポリリシンを無水コハク酸との反応によりブロックする。「遺伝子発現マイクロアレー (Gene Expression Microarrays)」(商標 GEM) と呼ばれるこれらのアレーは、正常の細胞から製造された cDNA を蛍光染料で標識し、次いで、異常な細胞からの cDNA を異なった色の蛍光染料で標識することにより用いられる。これらの2つの標識された cDNA プローブは同時にマイクロアレーに適用され、そこで、それらは相補的に整列した cDNA 分子に結合する。この2つの色のコード技術は、2つの細胞試料の間の遺伝子発現の相違を同定するために用いられる。(Heller, R.A. 他「Proc. Natl. Acad. Sci, USA」94, p. 2150~2155 (1997年))。

#### 【0009】

他は、プソラレンとして知られる光架橋性化合物を記載した。プソラレンは、核酸ヘリックス内に挿入する平面形状を有する多環式化合物である。紫外光を照射する時、挿入されたプソラレンは、DNA分子内に相互鎖結合の形成を誘導する。プソラレンで5'-末端に誘導体化されたオリゴヌクレオチドは溶液中の二本鎖核酸 (Pieles及びU. Englisch「Nucleic Acid Res.」17 (1), p. 285 ~299, 1989年) または三本鎖核酸 (Takasugi, M. 他「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」88 (13), p. 5602 ~5606 (1991)) を架橋するのに用いられてきた。プソラレン誘導体は、DNA結合性タンパク質をDNAに架橋させるのにも用いられてきた (Sastry, S.S. 他「J. Biol. Chem.」272 (6), p. 3715 ~3723 (1997))。

#### 【0010】

異なった用途においては、プソラレン誘導体は、固体支持体、たとえば、ポリスチレンの表面に官能性基を共有結合させるのに用いられた。それらの官能基は次いで、順番に、支持体表面に化合物を熱化学的に結合させるのに用いられる (Goodchild, J.「Bioconjugate Chem.」1 (3), p. 165 ~187 (1990年))。目下、Nalge Nunc Internationalは、この方法を用いて、分子、たとえば、核酸の熱化学的結合のためのアミン官能化表面を供給するマイクロプレートを製造する。たとえば、「DNAアッセイ進歩：分子スクリーニング及び診断のための表面化学及びフォーマット (DNA Assay Developments: Surface Chemistry and Format

s for Molecular Screening and Diagnostics )」 B. Sullivan他、1997年6月4日、Nalge Nunc International Corporation product literature 参照。

#### 【0011】

別の課題に関して、本発明の譲り受け人は、光化学及び特に、たとえば、ポリマー及び他の分子を支持体表面に結合させるための光反応性基の使用のための多数の出願を過去に記載してきた。たとえば、米国特許第4,722,906号、第4,979,959号、第5,217,492号、第5,512,329号、第5,563,056号、第5,637,460号及び第5,714,360号並びに国際特許出願PCT/US96/08797号（ウイルス不活性化塗料）、PCT/US96/07695号（毛細管内皮化）及びPCT/US97/05344号（連鎖移動剤）を参照のこと。

#### 【0012】

しかしながら、出願人の知識の限りでは、当技術は、特異的かつ制御可能な仕方では核酸を表面に結合させるための側鎖光反応性基の活性化を教示していないばかりか、それを包含する市販の製品もない。照射による表面への核酸の固定は放射線誘導損傷を受けやすいように見え、かつ、本質的に特異的でないだろう。たとえば、M. Pirrung 他「J. Org. Chem.」63, p. 241 ~ 246 (1998 年)（「〔脱保護の間の〕 < 340 nm の波長の照射は、… DNA への光化学的損傷の可能性に基づき… 避けるべきである」と述べている）参照。

#### 【0013】

現在までの進歩にもかかわらず、たとえば、オリゴヌクレオチドプローブアレイを形成するために、多数の支持材料への核酸の固定化を改良する方法及び試薬の必要性が相変わらず存在する。

#### 発明の概要

本発明は1以上の結合した光反応性基を有する核酸の形で、光活性化可能な核酸誘導体を含む組成物を提供する。光反応性基は、好ましくは、核酸の間の1以上の点に、直接的または間接的に共有結合している。上記基は、固体支持体の表面、たとえば、チップの表面に核酸を結合させるために活性化させることができる。本発明の光反応性基は、核酸内のいかなる照射を受けやすい基または結合か



らも、分離され及び別個のものである。光基は、支持体に核酸を結合させるために、そして、その所望の化学的または生物学的機能を実質的に維持する方法で、選択的にかつ特異的に活性化することができる誘導体化核酸を順次供給する。

#### 【0014】

本明細書で用いる場合、特記されていなければ、「光反応性化合物」は、1以上の「光反応性基」であるか、あるいは1以上の「光反応性基」を含有し、直接的または間接的に共有結合し、そして、垂れ下がっている1以上の光反応性基を有する「光活性化可能な核酸誘導體」を生成させるために核酸を誘導体化するのに用いることができる化合物である。「直接」及びその語形変化により、光反応性化合物が直接的に核酸に結合していることを意味し、それに対し、「間接」及びその語形変化は、共通の構造、たとえば、合成または天然ポリマーへの光反応性化合物及び核酸の結合を指す。

#### 【0015】

出願人は光反応性基を誘導体化された核酸を形成するのに用い得ることを発見した。誘導体化された核酸は、意図した目的のための固定化核酸の使用に有害に影響を与えない方法で支持体の表面に核酸を結合させるために、順次、活性化することができる。

本発明は、さらに、たとえば、1以上の光反応性基を有する核酸を誘導体化することにより、上記組成物を製造する方法を提供する。得られた光-誘導体化核酸（たとえば、オリゴヌクレオチド）は、適当な照射の適用により、通常、表面の予備処理の必要なしで、種々のポリマー基体表面に共有的に固定化できる。したがって、1態様では、本発明は、1以上の光反応性基の核酸への熱化学的結合及びその核酸誘導體の基体表面への光化学的固定化の両方を含む方法を提供する。本発明は、たとえば、印刷または光リトグラフ技術の使用による、固定化核酸のアレーの製作に特に役に立つ。

#### 【0016】

本明細書に記載される好ましい態様において、表面に核酸を共有結合する格別の利点は、固定化核酸の点の間の領域が疎水性のままであり、それにより、点の間に明確な区別を与えることである。吸着よりも安定な共有結合という明らかな

利点もある。安定な結合は、ストリンジェントなハイブリダイゼーションが必要な用途、または、熱サイクルを含むか、多数のプローブが必要な、増幅技術、たとえば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が用いられる用途においては重要である。

#### 【0017】

他の面では、本発明は、本明細書に記載されたような光活性化可能な核酸組成物を用いることにより核酸プローブアレーを製作する方法を提供する。さらに別の面では、本発明は1以上の光活性化可能な核酸誘導体を用いることにより製作された核酸プローブアレーを提供する。

光活性化可能な核酸誘導体は任意の適当な形、たとえば、1以上の光基を有する単一の核酸の形を取り得る。使用に際して、本発明の光活性化可能な核酸誘導体は、核酸プローブアレーの製作、または核酸の固定化を包含する他の方法のための独特で便利な方法を提供する。

#### 【0018】

##### （詳細な説明）

本発明の光活性化可能な核酸誘導体は、核酸に結合した（たとえば、直接的または間接的に結合した）1以上の光反応性基の形で提供できる。本明細書で用いる場合、用語「核酸」はプリン及びピリミジン由来の塩基を有するポリヌクレオチド化合物の任意の群を包含する。本発明における核酸の特定の使用は、より一般的にオリゴヌクレオチドとして知られる、一般に短い合成配列を包含する。核酸は任意の適切な形、たとえば、一本鎖、二本鎖または核タンパク質として存在し得る。適切な核酸の例は、デオキシリボ核酸（DNA）（たとえば、相補DNA（cDNA））、リボ核酸（RNA）及びペプチド核酸（PNA）の合成及び／または天然分子を包含する。PNAは、未変性糖リン酸DNA主鎖がポリペプチドにより置換されている擬態のDNAである。この置換は、分子の安定性を増加することはもちろん親和性及び特異性の両方を改良すると言われる。

#### 【0019】

1以上の光基は任意の適切な方法で、たとえば、3'-末端、5'-末端、オリゴヌクレオチド自体の間（たとえば、核酸内の中間ヌクレオチドまたはスパー

サーに垂れ下がって)、またはそれらの組み合わせに光基を供給するような方法で、オリゴヌクレオチドを合成するか、あるいは、天然もしくは過去に合成したオリゴヌクレオチドを誘導体化することにより、核酸に結合(たとえば、直接的に)させることができる。

#### 【0020】

光活性化可能なオリゴヌクレオチド組成物のオリゴヌクレオチド成分は、ホスホジエステル化学及びより最近には固相ホスホラミダイト技術に基づく方法を包含する、任意の適切なアプローチを用いて合成することができる。一般的に、F. Eckstein編「オリゴヌクレオチド及び類似体 (Oligonucleotides and Analogus)」第1章第1~24頁 (IRL Press, 1991 年) のT. Brown 及びD. Brown の『オリゴヌクレオチド合成の新しい機械補助方法』参照(参照により、この開示を本明細書に組み入れる)。

#### 【0021】

オリゴヌクレオチドの段階的合成は、一般的に結合ヌクレオチド誘導体の5'-ヒドロキシル基と、連続する遊離ヌクレオチド誘導体の3'-ヒドロキシル基の間の連続的なジエステル結合の生成を包含する。合成過程は典型的には、固体支持体、たとえば、カラムに充填されたシリカゲルまたはホウケイ酸ガラスのビーズへのリンカー腕による、ヌクレオチドの3'-末端での結合から開始する。遊離ヌクレオチド誘導体の1個の基を活性化することができるためには、反応混合物中のどこか他の他の潜在的な活性基が可逆的化学修飾により「保護される」ことを必要とする。反応性ヌクレオチド誘導体は、3'-ホスフェート基が、たとえば、ジアルキルホスホラミダイトにより置換されており、活性化により、結合ヌクレオチドの遊離5'-ヒドロキシル基と反応して、ホスファイトトリエステルを生成する、遊離モノマーである。ホスファイトトリエステルは次いで次の合成段階の前に安定なホスホトリエステルに酸化される。

#### 【0022】

固定化反応体の3'-ヒドロキシルはその支持体への結合のせいで保護され、遊離モノマーの5'-ヒドロキシルは、自己重合を防ぐためにジメトキシトリチル(DMT)基により保護することができる。通常、3'-ホスフェートのヒド

ロキシルを保護するために2-シアノエチル基が用いられる。さらに個々の塩基の反応性基も保護される。種々の化学技術が、ヌクレオチドの環外アミノ基の保護のために開発されてきた。N-アセチル化デオキシヌクレオチドを製造するためにN-アセチル保護基を用いることが、この目的のために広く受け入れられた。

#### 【0023】

各反応後、過剰の試薬はカラムから洗い出され、あらゆる未反応の5'-ヒドロキシル基は無水酢酸を用いてブロックまたは「キャップ」され、5'-DMT基はジクロル酢酸を用いて除去され、延長された結合オリゴマーを次の合成のラウンドにおいて他の活性化モノマーと反応させることを可能にする。

最後に、完全に構築されたオリゴヌクレオチドを固体支持体から切断し、脱保護して、HPLCまたはある他の方法により精製する。切断のために有用な試薬及び条件は結合の性質に依存する。スクシニル基を介する結合により一般的に供給されるエステル結合については、切断は、濃水酸化アンモニウム水溶液を用いる塩基の脱保護と同時に起り得る。

#### 【0024】

本発明の組成物は、本教示があれば、当業界内の技術を用いて核酸を修飾することにより製造することができる。核酸を修飾するための方法の概論は、「*Bioc onjugate Chem.*」 3 (1), p.165 ~186 (1990 年) に含有され、その開示を参照により本明細書に組み込む。上記方法は、未変性または合成DNAの化学的修飾、オリゴヌクレオチド合成及び酵素的修飾の間に導入される修飾を包含する。

#### 【0025】

本発明の1態様においては、天然または合成のいずれかの核酸を主鎖の間またはその3'-もしくは5'-末端のいずれかにランダムに結合した光反応性を用いて誘導体化できる。たとえば、核酸を構成するヌクレオチド上に存在する塩基は、光反応性基及び該塩基に共有結合するのに適切な熱化学的に反応性の基の両方を有する異種2官能性光反応性化合物を用いて誘導体化し得る多数の反応性基を有する。このアプローチは典型的には、主鎖の間の位置並びに1分子当りの光基の数の両方の点から、核酸の比較的に非選択性の誘導体化をもたらすだろう。

## 【0026】

代りの、より選択的な態様においては、本発明の方法は、合成の間に特異的部位、たとえば、主鎖の間またはその3'-もしくは5'-末端のいずれかに導入された化学的に反応性の基を有するオリゴヌクレオチドの合成後光誘導体化を包含することができる。たとえば、オリゴヌクレオチドのこれらの任意の位置にアミン基の導入を可能にする、市販の試薬または固体支持体を用いることができる。これらのアミン基は、次いで、光基を有する光反応性化合物とN-オキシスクシンイミドエステル(NOS)とを組み合わせ、光基とオリゴヌクレオチドとの間にアミド結合をもたらす。本記載があれば、当業者は親電子的種及び親核的種の間の種々の他の反応が同様な結合技術を与えることができるやり方を認識するだろう。たとえば、カルボン酸塩化物とアミンの反応またはマレイミド基とメルカプト基の反応は、同様に光活性化可能な核酸誘導体を与えるのに用いることができる。

## 【0027】

他の態様においては、オリゴ合成に典型的に用いられる1以上のヌクレオチド構築ブロックは、試薬のヌクレオチドの塩基残基に存在する反応性官能性の1つとの結合により、光反応性基を含有する試薬で自体誘導体化することができる。得られる誘導体化試薬を鎖の間の指定された点またはオリゴヌクレオチドのいずれかの末端に光基を導入するために、慣用の反応条件下に自動合成機において用いることができる。さらに、上記のように化学的に反応性の基の導入のために用いられる、市販の非-ヌクレオチド試薬を光反応性化合物と反応させて、光反応性基を導入することができ、その後、自動合成機中でそれらを用いて、光活性化可能な核酸を製造することができる。

## 【0028】

「Biotin-Chem-Linl」という商標でベーリンガー・マンハイム(インディアナ州インディアナポリス)から得られるものを包含する種々の試薬を核酸を修飾するのに用いることができる。このシスープラチナ試薬はグアノシン塩基及びアデノシン塩基のN7の位置に結合するだろう。同様な仕方で、シスープラチナ部分を含有する光反応性化合物を、核酸を光誘導体化するのに用いるために合成する

ことができる。

#### 【0029】

他の面では、光誘導体化ヌクレオチドを合成して、酵素技術を用いて核酸に導入することができる。たとえば、ビオチン、フルオレセイン及びジゴキシゲニン(DIG)で核酸を標識するのに用いることができる種々の試薬を入手することができる。

1個または多数の光基のいずれかをそれぞれ核酸の3'-末端に供給するために、末端トランスフェラーゼを用いて、核酸を光活性化可能なジデオキシリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドで標識できる。

#### 【0030】

ベーリンガー・マンハイムは、DNAのDIG-11-UTPを用いるランダム開始標識化のための「DIG-High-Prime」と呼ばれるDIG-標識化キットも販売している。「Biotin High Prime」及び「Fluorescein-High-Prime」製品も入手できる。同様な仕方で、当業者に明らかとなるように、クレノウ酵素を用いて、DNAを光活性化可能なデオキシリボヌクレオチドでランダム開始標識することができる。

#### 【0031】

DNAポリメラーゼI酵素はDNAのニック翻訳に一般的に用いられる。デオキシヌクレオチドトリリン酸(dNTP)の混合物中に光活性化可能なデオキシリボヌクレオチドを包含させることにより、得られる重合生成物はその端から端までの間に1以上の光反応性基を含有するだろう。また、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の間に、増幅生成物の標識化のためにdNTPの混合物中に光活性化可能なデオキシリボヌクレオチドを包含させることができる。たとえば、RNAポリメラーゼ(たとえば、SP6またはT7)及び標準転写プロトコルの使用により、光リボヌクレオチドをRNAに導入することも可能である。

#### 【0032】

本発明のさらなる態様においては、たとえば、出願中の1997年8月15日に出願された米国特許出願番号第08/916,913号である「生物学的に活性な部分を有する潜在性反応性ポリマー」(参照によりその開示を本明細書に組

み入れる)に記載されているように、その端から端までの間に1以上の光反応性基を供給するポリマーの主鎖の間にリガンドとして完全なオリゴを形成または結合することにより、オリゴを光反応性基で誘導体化できる。上記重合光-オリゴ試薬の製造のために多数のアプローチを用いることができる。

### 【0033】

1態様では、重合性ビニル基、たとえば、アクリロイル基を、末端または主鎖の間のいずれかでのオリゴへの共有結合によりオリゴをモノマーの形で製造することができる。これは、塩化アクリロイルとアミン誘導体化オリゴとの反応により達成できる。次いで、これらのオリゴモノマーを他のコモノマー、たとえば、アクリルアミドまたはビニルピロリドンといっしょに光誘導体化モノマーと共に共重合することができる。得られるポリマーはポリマーの主鎖の間にランダムに結合した光基とオリゴを与える。代りに、構造の一部として1以上の光反応性基を有する連鎖移動剤を用いることにより、ポリマーの末端に光反応性基を有するポリマーを製造することができる。

### 【0034】

さらなる態様においては、本発明の組成物を形成するために光反応性ポリマー(たとえば、自体光基を供給されている予備生成した合成または天然ポリマー)をオリゴで誘導体化できる。このアプローチでは、各々が適切に置換されたオリゴと反応性である、ポリマーの主鎖に位置する化学的に反応性の基をもつために、ポリマーを製造または修飾できる。たとえば、活性化された基、たとえば、N O S エステルを有するポリマーは、アミン官能性を含有するオリゴと反応でき、アミド結合によりポリマーの主鎖へのオリゴの共有結合をもたらす。重合体部分自体は、オリゴへの結合の前、間または後のいずれかで、光基で誘導体化できる。たとえば、光誘導体化ポリマーは、光誘導体化モノマーを包含するモノマーを重合することにより製造できるか、あるいは1以上の光基をオリゴに関して上記したのと同様な方法で生成したポリマーに加えることができる。代りに、構造の一部として光基を有する連鎖移動剤を用いることにより末端光反応性基を有するポリマーを製造することができる。次いで、オリゴを第2工程で反応性基に加えるだろう。

## 【0035】

## 光反応性基

本発明の好ましい組成物は、核酸に直接的または間接的に共有結合した1以上の側鎖潜在反応性（好ましくは光反応性）基を包含する。光反応性基は本明細書で定義され、そして、好ましい基は、それらが上記性質を維持する条件下で貯蔵するのに十分に安定である。たとえば、米国特許第5,002,582号（参照により、この開示を本明細書に組み入れる）参照。電磁スペクトルの種々の部分に対して反応する潜在反応性基を選ぶことができ、スペクトルの紫外及び可視部に反応するもの（「光反応性」と本明細書でいう）が特に好ましい。

## 【0036】

光反応性基は、特異的に適用された外部刺激に応答して、活性種の発生を受け、たとえば、同じまたは異なった分子により与えられたような、隣接する化学構造への共有結合を生ずる。光反応性基は、貯蔵条件下においてはその共有結合を未変化のまま維持するが、外部エネルギー源による活性化により、他の分子と共有する結合を生成する、分子中の原子の群である。

## 【0037】

光反応性基は、活性種、たとえば、フリーラジカル及び特にニトレン、カルベン及び電磁エネルギーの吸収により励起状態のケトンを生じる。光反応性基は電磁スペクトルの種々の部分に応答するように選択することができ、たとえば、スペクトルの紫外及び可視部に応答する光反応性基が好ましく、これを本明細書においては、時々、「光化学基」または「光基」という。

## 【0038】

光反応性アリールケトン、たとえば、アセトフェノン、ベンゾフェノン、アントラキノン、アントロン及びアントロン様複素環（すなわち、アントロンの複素環類似体、たとえば、10位にN、OまたはSを有するもの）またはそれらの置換された（たとえば、環に置換された）誘導体が好ましい。好ましいアリールケトンの例は、アクリドン、キサントン及びチオキサントン並びにそれらの環置換誘導体を包含する、アントロンの複素環誘導体を包含する。特に好ましいのは、約360nmよりも大きい励起エネルギーを有する、チオキサントン及びその誘導



体である。

### 【0039】

上記ケトンの官能基は本明細書に記載された、活性化／不活性化／再活性化サイクルを容易に受けることが可能であるから好ましい。ベンゾフェノンは、三重状態にシステム間交差を受ける励起された一重状態の最初の生成を伴う光化学的励起が可能であるから、特に好ましい光反応性部分である。励起された三重状態は、水素原子の引き抜き（たとえば、支持体表面から）により、炭素－水素結合に入って、したがって、ラジカル対を作る。ラジカル対の連続的な崩壊は新しい炭素－炭素結合の生成をもたらす。反応性の結合（たとえば、炭素－水素）が、結合のために得られないなら、ベンゾフェノン基の紫外光誘導励起は可逆的であり、分子はエネルギー源の除去による基底状態のエネルギーレベルまでもどる。ベンゾフェノン及びアセトフェノンのような光活性化可能なアリールケトンは、これらの基が水中で多数の再活性化を受け、したがって、被覆効率を増大させるので、特に重要である。

### 【0040】

アジドは好ましい類の光反応性基を構成し、アリールアジド ( $C_6H_5N_3$ )、たとえば、フェニルアジド及び特に4-フルオロ-3-ニトロフェニルアジド、アシルアジド ( $-CO-N_3$ )、たとえば、ベンゾイルアジド及びp-メチルベンゾイルアジド、アジドホルメート ( $-O-CO-N_3$ )、たとえば、エチルアジドホルメート、フェニルアジドホルメート、スルホニルアジド ( $-SO_2-N_3$ )、たとえば、ベンゼンスルホニルアジド並びにホスホリルアジド ( $RO-PON_3$ )、たとえば、ジフェニルホスホリルアジド及びジエチルホスホリルアジドを包含する。ジアゾ化合物は他の類の光反応性基を構成し、ジアゾアルカン ( $-CHN_2$ )、たとえば、ジアゾメタン及びジフェニルジアゾメタン、ジアゾケトン ( $-CO-CHN_2$ )、たとえば、ジアゾアセトフェノン及び1-トリフルオロメチル-1-ジアゾ-2-ペンタノン、ジアゾアセテート ( $-O-CO-CHN_2$ )、たとえば、t-ブチルジアゾアセテート及びフェニルジアゾアセテート並びにβ-ケト-α-ジアゾアセテート ( $-CO-CN_2-CO-O-$ )、たとえば、t-ブチルα-ジアゾアセトアセテートを包含する。他の光反応性基は

、ジアジリン ( $=\text{CHN}_2$ )、たとえば、3-トリフルオルメチル-3-フェニルジアジリン並びにケテン ( $-\text{CH}=\text{C}=\text{O}$ )、たとえば、ケテン及びジフェニルケテンを包含する。

# 【0041】

光反応性基の活性化により、試薬分子は、互いに及び／または材料表面に光反応性基の残基による共有結合により共有結合する。代表的な光反応性基及びそれらの活性化による残基を下記に示す。

光反応性	基	残基の官能性
アリールアジド	アミン	$\text{R}-\text{NH}-\text{R}'$
アシルアジド	アミド	$\text{R}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}'$
アジドホルメート	カーバメート	$\text{R}-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}'$
スルホニルアジド	スルホンアミド	$\text{R}-\text{SO}_2-\text{NH}-\text{R}'$
ホスホリルアジド	ホスホルアミド	$(\text{RO})_2\text{PO}-\text{NH}-\text{R}'$
ジアゾアルカン	新しいC-C結合	
ジアゾケトン	新しいC-C結合及びケトン	
ジアゾアセテート	新しいC-C結合及びエステル	
$\beta$ -ケト- $\alpha$ -ジアゾアセテート	新しいC-C結合及び $\beta$ -ケトエステル	
脂肪族アゾ	新しいC-C結合	
ジアジリン	新しいC-C結合	
ケテン	新しいC-C結合	
光活性化ケトン	新しいC-C結合及びアルコール	

本発明の光活性化可能な核酸は、光反応性基が反応して表面に核酸を固定する炭素-水素結合を有するあらゆる表面に適用し得る。適当な基体の例は、限定するものではないが、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ(塩化ビニル)、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、ポリレン及びガラスまたは他の無機表面を予備処理するために用いられる多数のオルガノシランのいかなるものも包含する。光活性化可能な核酸を整列させて表面にプリントし、次いで、均一な照明により光活性化して、それらを特異的な型で表面に固定化する。それらは表

面に連続して均一に適用することもでき、次いで、一連のマスクを通す照明により、特異的領域に特異的な配列を固定化する。かくの如く、異なったマスクを通す多数回の照明を用いる特異的光誘導体化核酸の多数回の連続的な適用及び各光カップリング工程後の未結合光核酸を除去するための注意深い洗浄を用いて固定化核酸のアレーを製造することができる。光活性化可能な核酸も、適用及び光固定化により表面に均一に固定化できる。

#### 【0042】

本発明を次の非限定例を参照してさらに説明する。本発明の範囲から離れることなしに、記載の態様に多くの変更ができることは当業者に明らかであろう。したがって、本発明の範囲をこの出願に記載された態様に限定すべきでなく、特許請求の範囲の言語及び態様とに均等なものによってのみ限定さるべきであろう。特に記載のない場合は、すべてのパーセントは質量による。

#### 【0043】

例

例1

ペンゾフェノン置換オリゴヌクレオチドの製造

(a) N-スクシンイミジル6-(4-ベンゾイルベンズアミド)ヘキサノエート(BBA-EAC-NOS)の製造

例3(a)に記載したように製造した、60g(0.246モル)の4-ベンゾイルベンゾイルクロリドを900mlのクロロホルムに溶解した。33.8(0.258モル)の6-アミノヘキサン酸を750mlの1N NaOHに溶解し、酸塩化物溶液を攪拌しながら加えた。混合物を室温で45分間激しく攪拌して乳化液を生成させた。次いで生成物を75mlの12NのHClで酸性化して500mlのクロロホルムで3回抽出した。抽出物をいっしょにして、硫酸ナトリウムにより乾燥し、ろ過し、減圧下に蒸発させた。6-(4-ベンゾイルベンズアミド)ヘキサン酸をトルエン/酢酸エチル(容積で3/1)で再結晶し、融点106.5~109.5℃の生成物77.19g(収率93%)を得た。

#### 【0044】

60g(0.177ミリモル)の6-(4-ベンゾイルベンズアミド)ヘキサ

ン酸を乾燥フラスコに加え、1200mlの乾燥1,4-ジオキサン酸に溶解した。21.4g (0.186モル)のN-ヒドロキシスクシンイミドを加え、続いて、41.9g (0.203モル)の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドを加え、反応を湿分から保護するために乾燥管の下に混合物を室温で一晩攪拌した。1,3-ジシクロヘキシル尿素を除去するためのろ過後、減圧下に溶媒を除去し、得られた油を300mlのジオキサンで希釈した。生成したあらゆる残存固体をろ過により除去し、溶媒の除去後、BBA-EAC-NOSをエタノールから2回再結晶し、60.31gの融点123~126℃の白色固体を得た。

(b) アミノ修飾オリゴヌクレオチドの光誘導体化

C-12スパーサー (アミン-配列1) を含有する5'-アミノ修飾剤を用いて合成した30塩基のオリゴマー (-mer) プローブ [配列 (または「Seq」) 1] をMidland Certified Reagent Company (テキサス州, ミッドランド) で注文作成させた。100 $\mu$ g (10ナノモル、39.4 $\mu$ lの2.54mg/水中のストックのml) のオリゴヌクレオチドアミン-配列1を、43.8 $\mu$ g (100ナノモル、8.8 $\mu$ lの5mg/DMF中のストックのml) の例1(a)に記載したように製造したBBA-EAC-NOS及び4 $\mu$ lの1Mの重炭酸ナトリウム、pH9を有するミクロ遠心環中でシェーカー上で混合した。反応を室温で3時間進行させた。未反応BBA-EAC-NOSを取り除くために、148 $\mu$ lのリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS、10mMの $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、150mMの $\text{NaCl}$ 、pH2.2) で反応液を希釈し、次いで、製造者の仕様書に従って、NAP-5カラム (Pharmacia Biotech、スウェーデン国ウプサラ) 上に載せた。カラムを平衡化し、カラムのオリゴヌクレオチドを溶離するためにPBSを用いた。Sephadex G-25ゲルを含有する、NAP-5カラムは小さい分子量の化合物からオリゴヌクレオチドを分離した。総計3.1 A<sub>260</sub>単位または96 $\mu$ gのベンゾフェノン誘導体化オリゴヌクレオチド配列1が回収された。

【0045】

例2

ベンゾフェノン置換ヌクレオチドの評価

1ウェル当たり5ピコモル/0.1mlのオリゴアミン-配列1及びベンゾフェノ

ン配列1をポリプロピレン (PP、コーニング コスター、メイン州、ケンブリッジ) ミクロウェルプレート中で、インキュベーション緩衝液 (50 mMのリン酸緩衝液、pH 8.5、1 mMのEDTA、15%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 中で室温で一晩インキュベートした。プレートの半分を、Heraeus 電球 (W.C.Heraeus GmbH、独連邦共和国、ハナウ) 及び300 nm未満のすべての光を遮断するカットオフフィルターを含有するDymax ランプ (型番号PC-2、Dymax Corporation、コネチカット州、トリトン) で照明した。照明の持続時間は、330~340 nmの波長範囲で1~2 mW/cm<sup>2</sup> の強度で、2分間であった。照明しなかった残りの半分のプレートは、吸着したオリゴ対照として役立った。次いで、すべてのプレートを、0.05%のTween 20を含有するPBSで、ミクロプレート自動洗浄機 (Microplate Auto Washer、型EL403H、Bio-Tek Instruments、バーモント州、ウィヌースキ) を用いて洗浄した。

#### 【0046】

ハイブリダイゼーションを、相補的検出プローブ (配列2) または非相補的オリゴヌクレオチド (配列3) を用いて、下記のように実施した。両オリゴはメイヨークリニック (Mayo Clinic、ミネソタ州、ロチェスター) から入手した。プレートを、5×SSC (0.75 MのNaCl、0.075 Mのクエン酸、pH 7.0)、0.1%のラウロイルサルコシン、1%のカゼイン及び0.02%のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) からなるハイブリダイゼーション緩衝液で、55℃で30分間ブロックした。検出プローブを固定化プローブにハイブリダイズした時、1ウェル当たり0.1 ml中の50 フェムトモルの検出プローブのアリコートを加えて、55℃で1時間インキュベートした。次いでプレートを0.1%のSDSを含有するSSCで、5分間、2回、洗浄した。結合した検出プローブを1 ml当たり0.5 µgのストレプトアビジンとホースラディッシュペルオキシダーゼの複合体 (SA-HRP、Pierce、イリノイ州、ロックフォード) を加え、37℃で30分間インキュベートして、検定した。次いで、プレートをPBS/Tweenで洗浄し、その後、ペルオキシダーゼ基質 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  及びテトラメチルベンジジン、Kirke and Perry Laboratories、メリーランド州、ガイサースブルグ) を添加し、20分後にミクロウェルプレート読取り機 (型3550、Bio-Rad Labs

、マサチューセッツ州、ケンブリッジ) で655 nmで測定した。

【0047】

表1に列挙された結果は、ベンゾフェノン誘導体化オリゴヌクレオチドは、吸着されたオリゴヌクレオチド対照よりも高いハイブリダイゼーションシグナルを与えたことを示す。逆に照明され吸着された非誘導体化オリゴヌクレオチドにより生じたハイブリダイゼーションシグナルの間に差はなかった。

【0048】

【表1】

表1：PPマイクロウェルプレート上のアミン-配列1及びベンゾフェノン-配列1からのハイブリダイゼーションシグナル ( $A_{655}$  ±標準偏差)

	吸着対照		照 明	
	相補的検出 配列2	非相補的検出 配列3	相補的検出 配列2	非相補的検出 配列3
アミン- 配列1	0.289±0.025	0.014±0.005	0.250±0.023	0.069±0.005
ベンゾフェノ ン-配列1	0.143±0.034	0.008±0.007	0.456±0.027	0.026±0.005

【0049】

例3

オリゴヌクレオチドで誘導体化した光ポリマーの製造及び評価

(a) 4-ベンゾイルベンゾイルクロリド (BBA-C1) の製造

1 kg (4.42 モル) の4-ベンゾイル安息香酸 (BBA) を還流凝縮器及び頭上攪拌機を装填した、乾燥5リットルモートンフラスコに加え、次いで、645 ml (8.84 モル) の塩化チオニル及び725 mlのトルエンを加えた。次いで、3.5 mlのジメチルホルムアミドを加え、混合物を還流で4時間加熱した。冷却後、減圧下に溶媒を除去し、残存塩化チオニルを各500 mlのトルエンを用いる3回の蒸発により除去した。トルエン/ヘキサン (容積で1/4) から再結晶化し、真空炉中での乾燥後、988 g (収率91%) の生成物を得た。生成物の融点は92~94℃であった。80 MHz ( $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )) での核

磁気共鳴 (NMR) 分析は、所望の生成物：芳香族プロトン  $\delta$  7.20~8.25 (m, 9H) と一致した。すべての化学的シフト値は、テトラメチルシラン内部標準から ppm でダウンフィールドであった。最終生成物を、例えば例3 (c) に記載したような光活性化可能なポリマーの合成において用いられるモノマーの製造に用いるため、または、例えば例1 (a) に記載されたような異種2官能性化合物のために貯蔵した。

(b) N-(3-アミノプロピル) メタクリルアミド・塩酸塩 (APMA) の製造

1910 g (25.77 mol) の1,3-ジアミノプロパンの1000 mlの  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中の溶液を12リットルモートンフラスコに加え、氷浴上で冷却した。次いで、1000 g (5.15 mol) の *t*-ブチルフェニルカーボネートの250 mlの  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中の溶液を15℃未満の反応温度に保つ速度で滴加した。添加後、混合物を室温まで温め、2時間攪拌した。反応混合物を900 mlの  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  及び500 gの水で希釈し、その後、2500 mlの2.2 NのNaOHをゆっくり加えた。溶液が塩基性であることを保証するための試験の後、生成物を分離漏斗に移し、有機層を除去し、抽出物1として取っておいた。次いで、水性層を各1250 mlの  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で3回抽出し、各抽出液を別個の分画として保持した。次いで、4つの有機抽出液を、0.6 NのNaOHの1つの1250 ml部分を用いて、分画1から分画4まで連続的に洗浄した。この洗浄手順は、0.6 NのNaOHの新鮮な1250 mlの部分を用いて2回目を繰り返した。次いで有機抽出液をいっしょにして  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  により乾燥させた。ろ過し、溶媒を一定の質量となるまで蒸発させると、825 gのN-モノ-*t*-BOC-1,3-ジアミノプロパンが得られ、それをさらに精製せずに用いた。

【0050】

806 g (5.23 mol) の無水メタクリル酸の1020 mlの  $\text{CHCl}_3$  溶液を頭上攪拌機を装備した12リットルモートンフラスコに入れ、氷浴上で冷却した。60 mgのフェノチアジンを反応抑制剤として加え、その後、825 mlの  $\text{CHCl}_3$  中の825 g (4.73 mol) のN-モノ-*t*-BOC-1,3-ジアミノプロパンを滴加した。全反応時間、反応温度を10℃未満に保つために添加速

度を制御した。添加の完了後、氷浴を取り除き、混合物を一晩攪拌した。生成物を2400mlの水で希釈し、分離漏斗に移した。徹底的な混合後、水性層を除去し、有機層を2400mlの2NのNaOHで洗浄して、水性層が塩基性であることを保証した。次いで、有機層を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ によって乾燥させ、ろ過して乾燥剤を除去した。生成物と溶媒を組み合わせた質量が約3000gとなるまで、 $\text{CHCl}_3$ 、溶媒の部分減圧下に除去した。次いで、所望の生成物を攪拌した $\text{CHCl}_3$ 、溶液に11リットルのヘキサンをゆっくり添加することにより沈澱させ、その後、4℃で一晩貯蔵した。

#### 【0051】

生成物をろ過により単離し、固体を900mlのヘキサン及び150mlの $\text{CHCl}_3$ 、の溶媒の組み合わせで2回すすいだ。固体の完全な乾燥により、DSCによる融点が85.8℃の900gのN-[N'-(t-ブチルオキシカルボニル)-3-アミノプロピル]-メタクリルアミドが得られた。NMR分光計による分析は所望の生成物と一致した： $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CHCl}_3$ ) アミドのNH 6.30-6.80、4.55-5.10 (m, 2H)、ビニルプロトン5.65、5.20 (m, 2H)、Nに隣接するメチレン2.90-3.45 (m, 4H)、メチル1.95 (m, 3H)、残存メチレン1.50-1.90 (m, 2H) 及びt-ブチル1.40 (s, 9H)。

#### 【0052】

3首、2リットル丸底フラスコに頭上攪拌機と気体散布管を装備した。700mlのメタノールをフラスコに加え、氷浴上で冷却した。攪拌しながら、溶媒中に約5リットル/分の速度で、合計40分間HClガスを泡立てた。指示薬としてフェノールフタレンを用いて、1NのNaOHで滴定して、最終HCl/MeOH溶液のモル濃度は、8.5Mであることが分かった。900g (3.71モル) のN-[N'-(t-ブチルオキシカルボニル)-3-アミノプロピル]-メタクリルアミドを頭上攪拌機及び気体出口アダプターを装備した5リットルモートンフラスコに加え、その後、1150mlのメタノール溶媒を添加した。この溶媒の容積でフラスコ中に多少の固体が残存した。30mgのフェノチアジンを反応抑制剤として加え、次いで、655ml (5.57モル) の8.5MのHCl/Me



OH溶液を添加した。固体は気体を発生しながら、ゆっくり溶解したが、反応は発熱性ではなかった。

### 【0053】

反応の完了を保証するために、混合物を室温で一晩攪拌した。次いでろ過により、あらゆる固体を取り除き、さらに30mgのフェノチアジンを加えた。次いで、溶媒を減圧下にストリップし、得られた固体残渣を3回、減圧下での1000mlのイソプロパノールの蒸発と共に共沸させた。最後に生成物を2000mlの還流イソプロパノールに溶解し、攪拌しながら4000mlの酢酸エチルをゆっくり加えた。混合物をゆっくり冷却させ、4℃で一晩貯蔵した。ろ過によりN-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩を単離し、一定量となるまで乾燥し、DSCによる124.7℃の融点を有する630gの収量を得た。NMR分光計による分析は所望の生成物と一致した：<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) ビニルプロトン5.60、5.30 (m, 2H)、アミドNに隣接するメチレン3.30 (t, 2H)、アミンNに隣接するメチレン2.95 (t, 2H)、メチル1.90 (m, 3H) 及び残存メチレン1.65-2.10 (m, 2H)。最終化合物を、例えば、例3(c)に記載したような光活性化可能なポリマーの合成に用いるモノマーを製造するのに用いるために貯蔵した。

### (c) N-[3-(4-ベンゾイルベンズアミド)プロピル]メタクリルアミド(BBA-APMA)の製造

例3(b)に記載の一般的な方法により製造した、120g(0.672モル)のAPMAを乾燥した2リットルの、頭上攪拌機を備えた3首丸底フラスコに加えた。反応抑制剤として、23~25gのフェノチアジンを加え、次いで800mlのクロロホルムを加えた。氷浴上で懸濁液を10℃未満に冷却し、例3(a)に記載の一般的な方法により製造した172.5g(0.705モル)のBBA-C1を固体として加えた。次いで、50mlのクロロホルム中の207ml(1.485モル)のトリエチルアミンを1~1.5時間にわたり滴加した。氷浴を除去し、周囲温度での攪拌を2.5時間継続した。次いで、生成物を600mlの0.3NのHCl及び300mlの0.07NのHClで2回洗浄した。硫酸ナトリウムによる乾燥後、クロロホルムを減圧下で除去し、生成物を各再結晶におい

て重合を防止するために23～25mgのフェノチアジンを用いて、トルエン/クロロホルム（容積で4/1）から2回再結晶した。BBA-APMAの典型的な収率は融点147～151℃で90%であった。NMR分光計による分析は所望の生成物と一致した：<sup>1</sup>H NMR（CDCl<sub>3</sub>）芳香族プロトン7.20-7.95（m, 9H）、アミドNH6.55（巾広t, 1H）、ビニルプロトン5.65、5.25（m, 2H）、アミドNに隣接するメチレン3.20-3.60（m, 4H）、メチル1.95（m, 3H）及び残存メチレン1.50-2.00（m, 2H）。最終化合物は、例えば、例3（e）に記載のような光活性化可能なポリマーの合成で使用するために貯蔵した。

（d）N-スクシンイミジル6-マレイミドヘキサノエート（MAL-EAC-NOS）の製造

官能化モノマーを次のように製造し、例3（e）に記載のように用いて、ポリマーの主鎖に活性化エステル基を導入した。100g（0.762モル）の6-アミノヘキサン酸を、頭上攪拌機及び乾燥管を装備した、3首3リットルフラスコ中の300mlの酢酸に溶解した。78.5g（0.801モル）の無水マレイン酸を200mlの酢酸に溶解し、6-アミノヘキサン酸溶液に加えた。混合物を沸とう水浴上で加熱しながら1時間攪拌すると、白色固体が生成した。室温で一晩冷却した後、ろ過により固体を収集し、50mlのヘキサンで2回すすいだ。乾燥後、Z-4-オキソ-5-アザ-2-ウンデセンジ酸の典型的な収量は、160～165℃の融点で（90～95%）であった。NMR分光計による分析は所望の生成物と一致した：<sup>1</sup>H NMR（DMSO-d<sub>6</sub>）アミドプロトン8.65-9.05（m, 1H）、ビニルプロトン6.10、6.30（d, 2H）、窒素に隣接するメチレン2.85-3.25（m, 2H）、カルボニルに隣接するメチレン2.15（t, 2H）及び残存メチレン1.00-1.75（m, 6H）。

【0054】

150g（0.654モル）の（Z）-4-オキソ-5-アザ-2-ウンデセンジ酸、68ml（73.5g、0.721モル）の無水酢酸及び500mgのフェノチアジンを、頭上攪拌機を装備した2リットル3首丸底フラスコに加えた。9

1 ml (0.653 モル) のトリエチルアミン及び600 mlのTHFを加え、混合物を攪拌しながら加熱して還流させた。合計4時間の還流後、暗色の混合物を60℃まで冷却し、250 mlの12 NのHClの3リットルの水の溶液中に注いだ。

#### 【0055】

混合物を室温で3時間攪拌し、次いで、セライト545パッドに通してろ過し、固体を除去した。ろ液を500 mlのクロロホルムで4回抽出し、いっしょにした抽出液を硫酸ナトリウムにより乾燥させた。重合を防止するために15 mgのフェノチアジンを加えた後、溶媒を減圧下で除去した。6-マレイミドヘキサン酸をヘキサン/クロロホルム（容積により2/1）から再結晶し、融点81~85℃の典型的な収量の76~83 g（55~60%）を得た。NMR分光計での分析は所望の生成物と一致した：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) マレイミドプロトン 6.55 (s, 2H)、窒素に隣接するメチレン3.40 (t, 2H)、カルボニルに隣接するメチレン2.30 (t, 2H) 及び残存メチレン1.05-1.85 (m, 6H)。

#### 【0056】

アルゴン雰囲気下で100 mlのクロロホルムに20 g (94.7ミリモルの) 6-マレイミドヘキサン酸を溶解し、次いで、41 ml (0.47モル) の塩化オキサリルを加えた。室温で2時間攪拌後、最後の過剰の塩化オキサリルを除去するのに25 mlの追加のクロロホルムを4回用いて、減圧下で溶媒を除去した。酸塩化物を100 mlのクロロホルムに溶解し、次いで、12 g (0.104モル) のN-ヒドロキシスクシンイミド及び16 ml (0.114モル) のトリエチルアミンを加えた。室温で一晩攪拌後、生成物を100 mlの水で4回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥させた。溶媒を除去すると24 gの生成物（82%）が得られ、それをさらに精製せずに用いた。NMR分光計による分析は、所望の生成物と一致した：<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) マレイミドプロトン6.60 (s, 2H)、窒素に隣接するメチレン3.45 (t, 2H)、スクシンイミジルプロトン2.80 (s, 4H)、カルボニルに隣接するメチレン2.55 (t, 2H) 及び残存メチレン1.15-2.00 (m, 6H)。最終生成物を、例えば、例

3 (e) に記載したような光活性化可能なポリマーの合成に用いるために貯蔵した。

(e) アクリルアミド、BBA-APMA及びMAL-EAC-NOSのコポリマーの製造

本発明の光活性化可能なコポリマーを次のようにして製造した。3.849 g (54.1ミリモル) のアクリルアミドを52.9 mlのテトラヒドロフラン (THF) に溶解し、次いで、例3 (c) に記載の一般的方法により製造した0.213 g (0.61ミリモル) のBBA-APMA、例3 (d) に記載の一般的方法により製造した0.938 g (3.04ミリモル) のMAL-EAC-NOS、0.053 ml (0.35ミリモル) のN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 及び0.142 g (0.86ミリモル) の2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) を溶解した。

【0057】

溶液を4分間のヘリウムの散布で脱酸素し、次いで、さらに4分間アルゴンの散布をした。次いでシールした容器を一晩55℃で加熱し、重合を完了させた。固体生成物をろ過により単離し、フィルターケーキをTHFとCHCl<sub>3</sub>で完全にすすいだ。生成物を30℃の真空炉で乾燥させ、5.234 gの白色固体を得た。NMR分析 (DMSO-d<sub>6</sub>) は2.75 ppm にNOS基の存在を確認し、光基の担持は0.104ミリモルBBA/ポリマーのgであると決定した。MAL-EAC-NOSはこの反応では重合性モノマーの5モル%であった。

(f) オリゴヌクレオチドで誘導体化された光ポリマーの製造と評価

40-マーのプロープ (配列4) を配列1について記載されたようなアミン修飾で合成した。40 µg (15 µl の2.67 mg/水中のストックのml) のオリゴアミン-配列4を80 µg (80 µl の1 mg/水中で新しく作成したml) のアクリルアミド、BBA-APMA及び例3 (e) に記載のようにして製造したMAL-EAC-NOSのコポリマー及び305 µlのインキュベート緩衝液と共にインキュベートした。反応混合物を室温で2時間攪拌した。得られた光ポリマー配列4をさらに精製せずに固定化のために用いた。

【0058】

1 ウェル当り 10 ピコモルのオリゴ／0.1 ml のアミン-配列 4 及び光ポリ-配列 4 を 50 mM のリン酸緩衝液、pH 8.5、1 mM の EDTA 中で PP 及びポリ（塩化ビニル）マイクロウェルプレート（PVC, Dynatech、バージニア州、チャンティリー）において、37℃で1.5時間インキュベートした。プレートを例 2 に記載したように照明または吸着させた。相補的配列 3 検出オリゴヌクレオチドまたは非相補的配列 2 オリゴヌクレオチドを用いて例 2 に記載のようにハイブリダイゼーションを行った。

#### 【0059】

表 2 の結果は、それぞれ、PP 及び PVC 表面について、照明した光ポリ-オリゴヌクレオチドは吸着した対照よりも 1.3～2 倍高いハイブリダイゼーションシグナルを有したことを示している。対照的に、照明はアミン-配列 4 固定化に対しては役に立たなかった。

#### 【0060】

#### 【表 2】

表 2：PP 及び PVC マイクロウェルプレート上のアミン-配列 4 及び光ポリ-配列 4 からのハイブリダイゼーションシグナル ( $A_{555} \pm$  標準偏差)

	吸着対照		照 明	
	相補的検出 配列 3	非相補的検出 配列 2	相補的検出 配列 3	非相補的検出 配列 2
PP プレート アミン- 配列 4 光ポリ- 配列 4	0.034 $\pm$ 0.034	0.011 $\pm$ 0.001	0.001 $\pm$ 0.002	0.014 $\pm$ 0.005
	0.099 $\pm$ 0.033	0.017 $\pm$ 0.015	1.356 $\pm$ 0.078	0.019 $\pm$ 0.021
PVC プレート アミン- 配列 4 光ポリ- 配列 4	0.153 $\pm$ 0.031	0.087 $\pm$ 0.025	0.001 $\pm$ 0.002	0.046 $\pm$ 0.006
	0.992 $\pm$ 0.071	0.097 $\pm$ 0.013	1.854 $\pm$ 0.042	0.087 $\pm$ 0.071

#### 【0061】

#### 例 4

直接合成によるベンゾフェノン標識化オリゴヌクレオチドの製造

## (a) 4-臭化メチルベンゾフェノン (BMBP) の製造

750 g (3.82 モル) の4-メチルベンゾフェノンを頭上攪拌機を装備した5リットルオートンフラスコに加え、2850 mlのベンゼンに溶解する。次いで溶液を加熱して還流させ、その後、330 mlのベンゼン中の610 g (3.82 モル) の臭素を滴加する。添加速度は約1.5 ml/分で、フラスコを90ワット (90 ジュール/秒) のハロゲンスポットライトで照明して、反応を開始させる。ランプにタイマーを用いて10%の使用サイクル (5秒点灯、40秒消灯) を与え、次いで、1時間内で、20%使用サイクル (10秒点灯、40秒消灯) を与える。冷却後、反応混合物を100 mlの水中の10 gの重亜硫酸ナトリウムで洗浄し、次いで、200 mlの水で3回洗浄する。生成物を硫酸ナトリウムで乾燥させ、トルエン/ヘキサン (容積で1/3) から2回再結晶する。最終化合物を、例4 (b) に記載のような核酸の誘導体化に適当な試薬の製造に使用するために貯蔵する。

(b) 4-ベンゾイルベンジルエーテル- $C_{12}$ -ホスホラミダイトの製造

5 g (24.7 ミリモル) の1, 12-ドデカンジオールを窒素の下で乾燥フラスコ中の50 mlの無水THFに溶解する。鉍油 (12.4 ミリモル) 中の0.494 gの水素化ナトリウムの60%の分散液を5分間にわたって分割して加えた。得られた混合物を室温で1時間攪拌する。例4 (a) に記載の一般的方法により製造した3.40 g (12.4 ミリモル) のBMBPを固体として、ヨウ化ナトリウム (0.185 g、1.23 ミリモル) 及び臭化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (0.398 g、1.23 ミリモル) と共に加える。混合物を24時間穏やかな還流で攪拌する。次いで、反応物を冷却し、水で反応を停止し、5%のHClで酸性化し、クロロホルムで抽出する。有機抽出液を硫酸ナトリウムにより乾燥させ、溶媒を真空下に除去する。生成物をクロロホルムを用いるシリカゲルフラッシュクロマトグラフカラムで精製して、非極性不純物を溶出し、次にクロロホルム:酢酸エチル (容積で80/20) で生成物を溶出する。適当な分画のプールは、減圧下の溶媒の除去後、所望の化合物を与える。

【0062】

上記からの0.100 g (0.252 ミリモル) のエーテル生成物をアルゴン

雰囲気下にクロロホルムに溶解する。0.130 g (1ミリモル) のN,N-ジイソプロピルエチルアミンを加え、氷浴を用いて温度を0℃に調整する。次いで、0.179 g (0.756ミリモル) のシアノエチルジイソプロピルクロロホスホラミダイトを3つの等しい部分に分けて約10分にわたって加える。合計3時間攪拌を継続し、その後、反応を5%のNaHCO<sub>3</sub>で反応を停止し、5mlのクロロホルムで希釈する。有機層を分離し、硫酸ナトリウムにより乾燥させ、蒸発させて残留油を与える。粗生成物をクロロホルム溶媒中の5%のメタノール、次いで、水酸化アンモニウム/メタノール/クロロホルムの溶媒系(容積で0.5/2.5/7)を用いて、シリカゲルフラッシュクロマトグラフカラムで精製する。適当な分画をプールし、溶媒を除去して、核酸の誘導体化に適切な所望の生成物を供給する。

(c) ベンゾフェノン標識化オリゴヌクレオチドの製造

30マーのオリゴヌクレオチドを標準的オリゴヌクレオチド手順を用いてシリカビーズ上で合成し、そのビーズをアルゴン雰囲気下にシールした容器に入れる。0.5mlのクロロホルム中の例4(b)で製造した、12.5mg(22μモル)のホスホラミダイトの溶液及び0.5mlのアセトニトリル中の5mg(71μモル)のテトラゾールの溶液を次いで加える。混合物を1時間穏かに攪拌し、次いで上清を除去する。ビーズをクロロホルム、アセトニトリル及び塩化メチレンで洗浄し、次に1.5mlのTHF/ピリジン/水(容積で40/20/1)中の0.1Mのヨウ素溶液で5分間酸化する。この溶液の除去後、ビーズを塩化メチレンで洗浄し、アルゴン流で乾燥する。次に濃水酸化アンモニウムをビーズに加え、室温に1時間置く。次いで、水酸化アンモニウム溶液を除去し、ビーズを更に1mlの水酸化アンモニウムですすぐ。次に、いっしょにした溶液抽出物を55℃で一晩貯蔵し、凍結乾燥して光標識化オリゴヌクレオチドを単離する。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 99/03862

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6	C07H1/08	C07H21/00 G01N33/543 C12Q1/68
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 C07H C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 91 16425 A (SIGRIST HANS ;KLINGLER DABRAL VIBHUTI (DE); DOLDER MAX (CH); WEGMU) 31 October 1991 see the whole document	1-24
Y	US 5 580 697 A (WYBOURNE MARTIN N ET AL) 3 December 1996 see the whole document	1-24
Y	US 5 217 492 A (GUIRE PATRICK ET AL) 8 June 1993 see the whole document	1-24
Y	US 4 973 493 A (GUIRE PATRICK E) 27 November 1990 see the whole document	1-24
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "B" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 June 1999		02/07/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hagenmaier, S

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inventor:   
 PCT/US 99/03862

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4 979 959 A (GUIRE PATRICK E) 25 December 1990 see the whole document	1-24
A	US 5 688 642 A (CALVERT JEFFREY M ET AL) 18 November 1997 see the whole document	
A	PEASE A C ET AL: "LIGHT-GENERATED OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS FOR RAPID DNA SEQUENCE ANALYSIS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, 1 May 1994, pages 5022-5026, XP000196311	
A	GUO Z ET AL: "DIRECT FLUORESCENCE ANALYSIS OF GENETIC POLYMORPHISMS BY HYBRIDIZATION WITH OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS ON GLASS SUPPORTS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 24, 11 December 1994, pages 5456-5465, XP002006248 see the whole document	
A	US 4 722 906 A (GUIRE PATRICK E) 2 February 1988 see the whole document	
A	WO 97 16544 A (BSI CORP ; SWAN DALE G (US); AMOS RICHARD A (US); EVERSON TERRENCE) 9 May 1997 see the whole document	
A	US 5 512 329 A (DUNKIRK SHAWN G ET AL) 30 April 1996 see the whole document	
A	US 5 563 056 A (SWAN DALE G ET AL) 8 October 1996 see the whole document	
A	DE 195 33 682 A (BIOTRONIK MES UND THERAPIEGERA) 13 March 1997 see the whole document	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern. Application No.  
PCT/US 99/03862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9116425 A	31-10-1991	AT 155524 T DE 59108783 D DK 484472 T EP 0484472 A	15-08-1997 21-08-1997 11-08-1997 13-05-1992
US 5580697 A	03-12-1996	US 5587273 A US 5582955 A AU 3306295 A AU 6231794 A CA 2154444 A EP 0680623 A JP 8509751 T US 5465151 A WO 9417447 A	24-12-1996 10-12-1996 14-12-1995 15-08-1994 04-08-1994 08-11-1995 15-10-1996 07-11-1995 04-08-1994
US 5217492 A	08-06-1993	US 4973493 A US 4722906 A US 5512329 A US 5741551 A US 5258041 A US 5002582 A AT 116863 T AU 615637 B AU 8232087 A CA 1305068 A DE 3750989 D DE 3750989 T EP 0326579 A JP 10179726 A JP 2500250 T JP 2741378 B WO 8802623 A US 4979959 A US 5263992 A	27-11-1990 02-02-1988 30-04-1996 21-04-1998 02-11-1990 26-03-1991 15-01-1995 10-10-1991 06-05-1988 14-07-1992 23-02-1995 18-05-1995 09-08-1989 07-07-1998 01-02-1990 15-04-1998 21-04-1988 25-12-1990 23-11-1993
US 4973493 A	27-11-1990	US 4722906 A US 5512329 A US 5741551 A US 5258041 A US 5217492 A US 5002582 A AT 116863 T AU 615637 B AU 8232087 A CA 1305068 A DE 3750989 D DE 3750989 T EP 0326579 A JP 10179726 A JP 2500250 T JP 2741378 B WO 8802623 A US 4979959 A US 5263992 A	02-02-1988 30-04-1996 21-04-1998 02-11-1993 08-06-1993 26-03-1991 15-01-1995 10-10-1991 06-05-1988 14-07-1992 23-02-1995 18-05-1995 09-08-1989 07-07-1998 01-02-1990 15-04-1998 21-04-1988 25-12-1990 23-11-1993
US 4979959 A	25-12-1990	US 5263992 A AT 116863 T AU 615637 B	23-11-1993 15-01-1995 10-10-1991

Form PCT/ISA/210 (patent family group) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat. Application No.  
PCT/US 99/03862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4979959 A		AU 8232087 A	06-05-1988
		CA 1305068 A	14-07-1992
		DE 3750989 D	23-02-1995
		DE 3750989 T	18-05-1995
		EP 0326579 A	09-08-1989
		JP 10179726 A	07-07-1998
		JP 2500250 T	01-02-1990
		JP 2741378 B	15-04-1998
		WO 8802623 A	21-04-1988
		US 4973493 A	27-11-1990
		US 5512329 A	30-04-1996
		US 5002582 A	26-03-1991
		US 5741551 A	21-04-1998
		US 5217492 A	08-06-1993
US 5688642 A	18-11-1997	NONE	
US 4722906 A	02-02-1988	US 4973493 A	27-11-1990
		US 5512329 A	30-04-1996
		US 5002582 A	26-03-1991
		US 5741551 A	21-04-1998
		US 5258041 A	02-11-1993
WO 9716544 A	09-05-1997	US 5217492 A	08-06-1993
		US 5714360 A	03-02-1998
		AU 7553196 A	22-05-1997
		CA 2236588 A	09-05-1997
US 5512329 A	30-04-1996	EP 0862624 A	09-09-1998
		US 5002582 A	26-03-1991
		US 4973493 A	27-11-1990
		US 4722906 A	02-02-1988
		US 5741551 A	21-04-1998
		CA 1340345 A	26-01-1999
		EP 0425485 A	08-05-1991
		JP 2855224 B	10-02-1999
		WO 9000887 A	08-02-1991
		AT 137104 T	15-05-1996
		CA 1335721 A	30-05-1995
		DE 3855238 D	30-05-1996
		DE 3855238 T	14-11-1996
		DK 152590 A	24-08-1990
		EP 0407390 A	16-01-1991
		JP 2855223 B	10-02-1999
		JP 3503005 T	11-07-1991
		NO 180657 B	10-02-1997
		WO 8905616 A	29-06-1989
		US 5258041 A	02-11-1993
		AT 116863 T	15-01-1995
		AU 615637 B	10-10-1991
		AU 8232087 A	06-05-1988
		CA 1305068 A	14-07-1992
		DE 3750989 D	23-02-1995
		DE 3750989 T	18-05-1995
		EP 0326579 A	09-08-1989
		JP 10179726 A	07-07-1998
		JP 2500250 T	01-02-1990
		JP 2741378 B	15-04-1998

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/US 99/03862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5512329 A		WO 8802623 A	21-04-1990
		US 4979959 A	25-12-1990
		US 5217492 A	08-06-1993
		US 5263992 A	23-11-1993
US 5563056 A	08-10-1996	AU 1482797 A	26-06-1997
		AU 3664693 A	03-09-1993
		CA 2107683 A	14-08-1993
		EP 0585436 A	09-03-1994
		JP 6506959 T	04-08-1994
		WO 9316176 A	19-08-1993
DE 19533682 A	13-03-1997	EP 0761244 A	12-03-1997
		US 5718726 A	17-02-1998

フロントページの続き

(72)発明者 オバーマン, ゲイリー ダブリュ.  
アメリカ合衆国, ミネソタ 55426, セン  
ト ルイス パーク, フロリダ アベニュー  
サウス 2740